

Potensi Kapang Endofit Belimbing Wuluh sebagai Kandidat Penghasil Senyawa Antidiabetes

The Potency of Endophytic Fungi from Belimbing Wuluh As Alternative Resources for Antidiabetics Compounds

Wahyu Hidayati^{1*}, Maharadingga¹, Rezza Syahputra¹

¹Fakultas Farmasi dan Sains, Universitas Muhammadiyah Prof. Dr. Hamka

*E-mail: wahyu_hidayati@uhamka.ac.id

Abstrak

Mikroba endofit, khususnya kapang endofit, telah banyak dilaporkan memiliki kemampuan untuk menghasilkan senyawa-senyawa yang dapat digunakan dalam bidang pengobatan. Salah satu tanaman obat yang dapat dieksplorasi mikroorganisme endofitnya adalah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* Linn.). Penelitian ini dilakukan sebagai penelitian awal untuk mengetahui potensi kapang endofit dari buah belimbing wuluh sebagai penghasil senyawa antidiabetes yang dilakukan dengan mengetahui aktivitas inhibisi terhadap enzim alfa-amilase. Untuk mencapai tujuan tersebut, beberapa tahap dilakukan dalam penelitian ini yang diawali dengan isolasi kapang endofit yang dilakukan dengan menghancurkan buah belimbing wuluh dan menyebarkannya pada medium *Potato Dextrose Agar* (PDA), dilanjutkan dengan fermentasi pada medium *Potato Dextrose Yeast* (PDY) dan ekstraksi dengan menggunakan pelarut etil asetat. Tahap akhir dari penelitian ini adalah uji aktivitas antidiabetes melalui uji inhibisi alfa amilase dengan menggunakan substrat lugol dan enzim alfa-amilase yang berasal dari *Bacillus* sp. Aktivitas penghambatan diketahui dengan melakukan pengukuran pada *microplate reader* pada panjang gelombang 595 nm. Pada penelitian ini diperoleh hasil bahwa 12 isolat kapang endofit dengan karakteristik morfologi yang berbeda-beda antar isolat memiliki potensi untuk menghasilkan senyawa antidiabetes yang terlihat dari adanya kemampuan menghambat aktivitas enzim alfa amilase dan isolat BW-10 memiliki aktivitas inhibisi paling tinggi diantara isolat lainnya, yaitu sebesar 45,564%. Hasil identifikasi molekuler menunjukkan isolat BW-10 memiliki kemiripan sekuen sebesar 99% dengan isolat *Trametes elegans*. Penelitian ini dapat dilanjutkan dengan uji aktivitas antidiabetes terhadap enzim lainnya dan identifikasi senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh kapang tersebut.

Kata kunci: Alfa amilase, Antidiabetes, Belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*), Kapang endofit

Abstract

*Endophytic microbes have been reported to have an important role in the production of secondary metabolites by the host plants. Moreover, some researches reported that these microbes, specifically endophytic fungi, are also able to produce metabolites to cure diseases, such as metabolic syndrome diseases. This study was conducted as a preliminary research to explore the potency of endophytic fungi isolated from fruits of *Averrhoa bilimbi* Linn. As an alternative resource for antidiabetes compounds production. Here, we screened the antidiabetes activity by analyzing the alpha-amylase inhibition activity. Several steps were performed in this research, which started by isolating endophytic fungi from sterilized fresh fruits, fermentation and extraction, and anti-diabetes activity analysis through alpha-amylase inhibition assay as the final step. In this study, we obtained 12 endophytic fungi isolates with different morphological characteristics between isolates have the potential to produce antidiabetic compounds that are seen from the ability to inhibit the activity of the alpha amylase enzyme. The most potential isolate was BW-10 isolate which had the highest inhibitory activity among other isolates, which is 45.564%. Molecular identification results showed isolate BW-10 has a similarity sequence of 99% with *Trametes elegans* isolate. Antidiabetics activity through various in vitro and in vivo evaluation and secondary metabolites identification are possible to be conducted as further research.*

Keywords: Alpha-amylase, Antidiabetics, *Averrhoa bilimbi*, Endophytic fungi

Pendahuluan

Saat ini, eksplorasi potensi mikroba endofit dalam menghasilkan senyawa yang berguna untuk pengobatan masih terus dilakukan dan memberikan suatu peluang untuk dijadikan sebagai sumber bahan alami baru. Salah satu potensi yang dapat diketahui lebih lanjut adalah kemampuan mikroorganisme tersebut, khususnya kapang endofit, dalam memproduksi senyawa antidiabetes.¹

Salah satu tanaman yang tumbuh di Indonesia dan dilaporkan dapat digunakan secara tradisional oleh masyarakat untuk menurunkan kadar gula darah adalah tanaman belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* Linn.). Belimbing wuluh merupakan salah satu tumbuhan yang biasa digunakan sebagai sarana pengobatan tradisional di Indonesia. Tanaman belimbing wuluh (*A. bilimbi* Linn.) telah dilaporkan secara ilmiah memiliki aktivitas antidiabetes, baik daun maupun buah.² Tan dkk³ melaporkan bahwa fraksi air dan butanol daun *A. bilimbi* Linn. dengan dosis 125 mg/mL dapat menurunkan kadar gula darah pada tikus yang diinduksi oleh streptozotocin. Ekstrak buah belimbing wuluh dilaporkan dapat menurunkan kadar glukosa darah pada tikus *Sprague Dawley* setelah 60 hari diberi perlakuan dengan ekstrak tersebut.⁴

Ada beberapa metode pengujian yang dapat digunakan untuk mengetahui kemampuan suatu bahan alam dapat digunakan untuk mengobati diabetes, antara lain adalah dengan melakukan uji untuk mengetahui kemampuan bahan alam tersebut dalam menghambat aktivitas enzim alfa-amilase.⁴⁻⁶ Buah *A. bilimbi* Linn. secara eksperimental dapat digunakan sebagai antidiabetes karena buah tersebut memiliki aktivitas inhibisi alfa-amilase. Buah belimbing wuluh telah diketahui memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim alfa-amilase dengan persentase penghambatan lebih besar dibandingkan buah kerukup.⁷

Potensi mikroba endofit, khususnya kapang endofit, dalam menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang dapat digunakan untuk mengobati diabetes harus dilakukan. Adanya kajian ilmiah mengenai kemampuan ekstrak buah *A. bilimbi* Linn. dalam menghambat kerja enzim alfa-amilase, maka perlu diketahui potensi mikroba endofit yang hidup di dalam jaringan buah belimbing wuluh untuk dapat dikembangkan sebagai penghasil senyawa antidiabetes.

Metabolisme karbohidrat pertama kali terjadi di dalam rongga mulut akibat adanya aktivasi kerja enzim alfa-amilase pada saliva, akan tetapi enzim tersebut tidak terlalu besar perannya dalam memecah karbohidrat. Pencernaan karbohidrat berlanjut di dalam duodenum oleh adanya enzim alfa-amilase dalam cairan pankreas. Di dalam duodenum, karbohidrat akan dirubah menjadi oligosakarida oleh enzim alfa-amilase tersebut yang kemudian akan dipecahkan menjadi glukosa oleh enzim alfa-glukosidase di dalam usus halus yang kemudian akan diserap oleh tubuh.⁸

Berdasarkan hal tersebut, maka enzim alfa-amilase perlu dihambat aktivitasnya disebabkan oleh peran enzim tersebut dalam mengubah karbohidrat menjadi glukosa yang dapat mengakibatkan terjadinya peningkatan kadar glukosa darah, khususnya pada pasien diabetes yang juga memiliki defisiensi insulin.⁹ Pada manusia, enzim ini dapat ditemukan dalam saliva dan cairan pankreas, akan tetapi enzim alfa-amilase yang terdapat dalam cairan pankreas memiliki peran paling penting dalam digesti karbohidrat.⁹⁻¹⁰

Penelitian ini merupakan penelitian awal untuk mengetahui potensi kapang endofit dari belimbing wuluh sebagai kandidat penghasil senyawa antidiabetes. Sebagai penelitian awal, maka uji aktivitas antidiabetes dilakukan dengan menggunakan uji inhibisi aktivitas enzim alfa-amilase, di mana enzim ini berperan

dalam memecah karbohidrat menjadi maltosa yang selanjutnya akan dirubah menjadi glukosa.

Metode

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Bioteknologi, Laboratorium Terpadu, Fakultas Farmasi dan Sains, Universitas Muhammadiyah Prof. DR. Hamka (UHAMKA). Buah belimbing wuluh yang digunakan merupakan buah matang yang diperoleh dari Kota Bekasi, Jawa Barat dan telah dilakukan determinasi di Herbarium Bogoriense Bidang Botani, Puslit Biologi, LIPI Cibinong, Bogor. Buah yang digunakan dideterminasi sebagai buah dari tanaman belimbing wuluh yang termasuk ke dalam suku *Oxalidaceae*.

Isolasi Kapang Endofit

Tahapan isolasi kapang endofit diawali dengan melakukan sterilisasi permukaan sesuai dengan prosedur yang digunakan oleh Widowati.¹¹ Sterilisasi buah belimbing wuluh dilakukan diawali dengan pencucian di bawah air mengalir yang dilanjutkan dengan perendaman buah menggunakan etanol 70% dan natrium hipoklorit. Sebanyak 1 g buah belimbing wuluh yang telah steril kemudian dikupas kulit buahnya dan dihaluskan dengan penggerusan dan dihomogenkan dalam akuades steril sebanyak 9 mL kemudian dilakukan pengenceran bertingkat hingga 10^{-5} . Sebanyak 0,1 mL larutan sampel dari pengenceran 10^{-3} hingga 10^{-5} disebar pada medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) yang mengandung kloramfenikol (0,05 mg/mL) dan diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari.¹²

Karakterisasi Makroskopis dan Mikroskopis Kapang Endofit

Karakterisasi morfologi, baik makroskopis maupun mikroskopis, dilakukan dengan menggunakan panduan identifikasi kapang yang dipaparkan oleh Humber.¹⁴ Identifikasi makroskopis

melibuti warna, warna sebaliknya, tekstur, diameter dan tepian. Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan beberapa parameter yang diamati, yaitu hifa bersekat atau tidak, pertumbuhan hifa, ada tidaknya konidia, dan bentuk konidia (bulat, silinder, berantai atau tidak beraturan).

Ekstraksi Metabolit Sekunder

Fermentasi dilakukan pada medium *Potato Dextrose Yeast* (PDY) sesuai dengan prosedur yang digunakan oleh Hidayati.¹⁵ Sebanyak 2 potong miselium kapang berukuran 1 x 1 cm dimasukkan ke dalam 20 mL medium PDY dan diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari dengan kecepatan sentrifugal sebesar 170 rpm. Supernatan hasil fermentasi yang telah dipisahkan dari kapang melalui metode sentrifugasi kemudian diekstraksi menggunakan pelarut etil asetat dengan perbandingan ekstrak : pelarut sebesar 1:3.

Uji Aktivitas Inhibisi Alfa-Amilase

Tahapan uji aktivitas inhibisi dilakukan dengan menggunakan akarbosa sebesar 30 ppm sebagai kontrol positif dan ekstrak sebesar 500 ppm sebagai sampel. Adapun prosedur dilakukan dengan menggunakan prosedur uji yang digunakan oleh Kellog dkk¹⁶ dan Cengiz dkk¹⁷ di mana sebanyak 35 μ L akarbosa atau sampel ditambahkan 5 μ L larutan substrat dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Setelah itu ditambahkan 10 μ L enzim alfa-amilase dari *Bacillus* sp (Sigma, A6380) dan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 10 menit. Hasil reaksi ditambah 30 μ L larutan lugol yang telah diencerkan dengan akuades (1:2) dan diukur absorbansinya dengan *microplate reader* (Bio-Rad) pada panjang gelombang 595 nm. Data absorbansi hasil pembacaan *microplate reader* dianalisa dengan menggunakan rumus yang lazim digunakan untuk mengukur persentase aktivitas inhibisi yaitu :

$$\% \text{aktivitas inhibisi} = \frac{C - S}{C} \times 100\%$$

Keterangan :

C= Absorbansi kontrol – absorbansi blanko kontrol

S= Absorbansi sampel – absorbansi blanko sampel

Identifikasi Molekuler Isolat Kapang Endofit dengan Aktivitas Inhibisi Alfa Amilase Terbaik

Tahap ini diawali dengan ekstraksi DNA menggunakan Wizard® *genomic DNA purification kit* (Promega, A1125) dan dilakukan sesuai metode yang terdapat pada protokol kit tersebut.¹⁸ Hasil ekstraksi DNA selanjutnya diamplifikasi menggunakan sepasang primer spesifik pada region *Internal Transcribed Spacer* (ITS), yaitu primer ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') dan ITS5 (5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAGG3') yang didesain oleh White dkk.¹⁹ Volume total reaksi PCR adalah sebesar 25 µl dengan komposisi sebagai berikut 100 ng DNA genom, 12,5 µl 2x PCR Master Mix (50 U *Taq* DNA polymerase dalam buffer yang sesuai (pH 8,5), 400 µM, dATP, 400 µM dTTP, 400 µM dGTP, 400 µM dATP, 3 mM MgCl₂. Campuran tersebut kemudian diinkubasi pada mesin *thermal cycler* pada suhu 96°C selama 2 menit dan siklus amplifikasi sebanyak 35 siklus: 96°C selama 1 menit, 55°C selama 1 menit dan 72°C selama 2 menit. Tahap akhir ekstensi dilakukan pada suhu 72°C selama 10 menit. Produk PCR kemudian diurutkan basa nukleotidanya di Lembaga Biologi Molekuler Eijkman, Jakarta, Indonesia. Proses analisa hasil sekruensing dilakukan menggunakan *software Geneious Prime 2019.2.1 (restricted version)*.²⁰ Identifikasi tingkat spesies dilakukan dengan melakukan *alignment* terhadap sekvens ITS yang terdapat pada *GenBank* melalui *Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTn). Hasil *alignment* dilanjutkan dengan konstruksi pohon filogenetik dengan *software*

Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) versi 7.0.26 yang dilakukan menggunakan *Maximum-Likelihood model Tamura-3 parameter*.²¹

Hasil

Aktivitas Inhibisi Enzim Alfa-amilase

Aktivitas penghambatan enzim alfa-amilase oleh isolat kapang endofit diketahui dengan menggunakan ekstrak hasil fermentasi yang direaksikan terhadap alfa-amilase dari *Bacillus* sp. (Sigma, A6380). Seluruh isolat kapang endofit buah belimbing wuluh memiliki kemampuan untuk menghambat aktivitas enzim alfa-amilase dengan persentase penghambatan yang berbeda-beda (Gambar 2). Di antara kedua belas isolat, tiga isolat kapang endofit memiliki kemampuan inhibisi diatas 30 %, yaitu isolat BW-8, BW-10, dan BW-12 (Gambar 2). Adapun kemampuan penghambatan enzim alfa-amilase oleh akarbosa dengan konsentrasi 30 ppm adalah sebesar 74,81%.

Karakterisasi Isolat dengan Kemampuan Penghambatan Terbaik Terhadap Enzim Alfa-Amilase

Isolat BW-10 memiliki aktivitas inhibisi terhadap enzim alfa-amilase dengan persentase sebesar 45,56%. Isolat tersebut memiliki karakteristik makroskopis memiliki hifa berwarna putih dengan permukaan berserabut halus dan memiliki lingkaran konsentris (Gambar 1 dan Tabel 1). Adapun karakteristik mikroskopis yang dimiliki oleh isolat tersebut memiliki hifa bercabang dan memiliki konidia (Gambar 1 dan Tabel 2)

Pada era paska genomik saat ini, identifikasi isolat menjadi lebih mudah dan akurat dengan menggunakan analisa yang didasarkan pada informasi DNA isolat. Hasil penyejajaran memperlihatkan jika sekvens kapang endofit BW-10 memiliki kemiripan dengan beberapa isolat kapang, yaitu *Pycnoporus* sp, *Leiotrametes* sp, *Trametes* sp, *Lenzites* sp, dan *Agaricales*

sp. Kapang endofit BW-10 yang diperoleh pada penelitian ini memiliki kekerabatan yang sangat dekat dengan *Trametes*

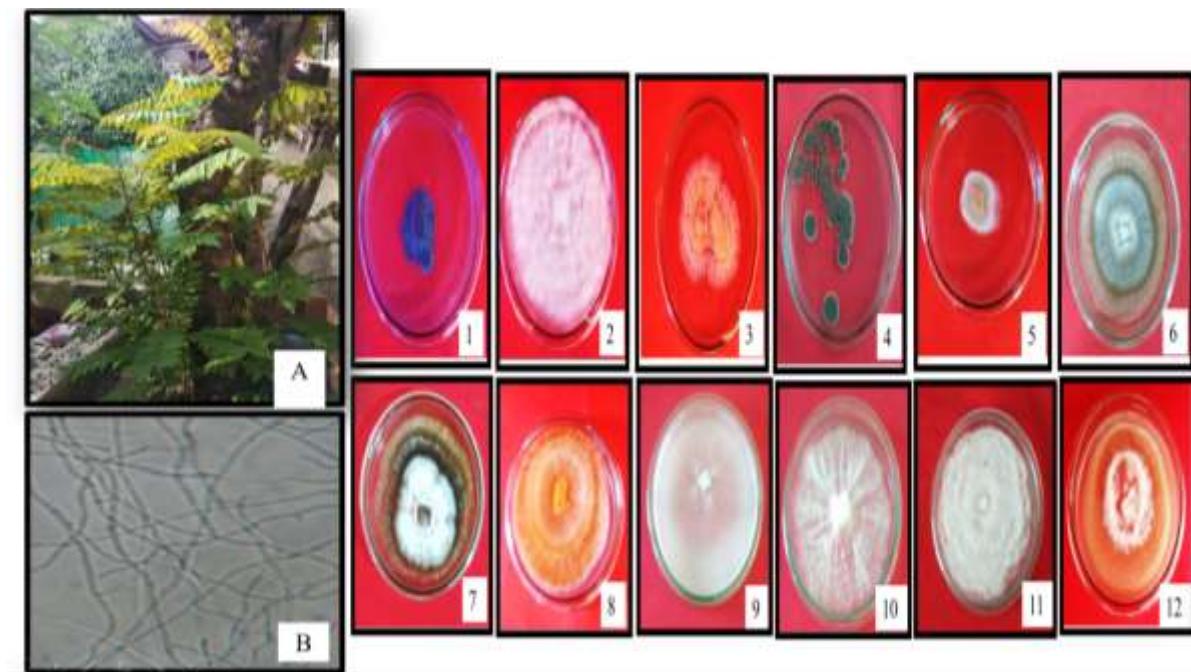
elegans (persen kemiripan 99,36%, Accession number KR080517.1) (Gambar 3).

Tabel 1. Karakteristik Makroskopis Isolat Kapang Endofit Buah Belimbing Wuluh

Kode Isolat	Karakteristik Makroskopis			
	Warna Isolat	Warna Sebalik Isolat	Bentuk Permukaan	Bentuk Tepi Koloni
BW-1	Hijau lumut, di atas putih	Hijau kehitaman, tidak terdapat lingkaran konsentris	Tebal keatas, diatasnya serabut seperti kapas	Halus dan rata
BW-2	Putih	Putih dan corak kecoklatan di tengahnya, tidak terdapat lingkaran konsentris	Serabut seperti kapas	Tidak beraturan, berserabut halus
BW-3	Putih	Jingga, tidak terdapat lingkaran konsentris	Serabut kasar seperti jarum	Tidak beraturan
BW-4	Hijau lumut, di atas putih	Kuning, tidak terdapat lingkaran konsentris	Serabut sangat halus	Halus dan rata
BW-5	Putih kekuningan	Kuning pudar, tidak terdapat lingkaran konsentris	Serabut agak kasar	Tidak beraturan
BW-6	Hijau pucat	Kuning keruh, terdapat lingkaran konsentris	Serabut halus dipinggir dan serabut seperti serbuk ditengah	Serabut halus dan rata
BW-7	Hijau pucat	Kuning keruh, terdapat lingkaran konsentris	Serabut seperti kapas	Halus dan rata
BW-8	Jingga	Putih kejinggaan, terdapat lingkaran konsentris	Serabut seperti kapas	Halus dan rata
BW-9	Putih	Putih terdapat lingkaran konsentris	Serabut halus	Serabut halus dan rata
BW-10	Putih	Putih terdapat lingkaran konsentris	Serabut halus	Serabut halus dan rata
BW-11	Putih	Putih terdapat lingkaran konsentris	Serabut seperti kapas	Serabut halus tidak beraturan
BW-12	Putih	Putih, di tengah agak kuning terdapat lingkaran konsentris	Serabut seperti kapas	Halus dan rata

Tabel 2. Karakteristik Mikroskopis Isolat Kapang Endofit Buah Belimbing Wuluh

Kode Isolat	Karakteristik Mikroskopis			
	Bentuk Hifa	Pertumbuhan Hifa	Konidia	Bentuk Konidia
BW-1	Bersekat	Bercabang	Ada	Rantai
BW-2	Bersekat	Bercabang	Ada	Rantai
BW-3	Bersekat	Tidak bercabang	-	-
BW-4	Tidak bersekat (berinti)	Tidak bercabang	Ada	Bulat dan rantai
BW-5	Bersekat (berinti)	Tidak bercabang	-	-
BW-6	Tidak bersekat (berinti)	Bercabang	-	-
BW-7	Tidak bersekat (berinti)	Bercabang	Ada	Bulat
BW-8	Tidak bersekat (berinti)	Bercabang	-	-
BW-9	Tidak bersekat (berinti)	Bercabang	Ada	Bulat
BW-10	Tidak bersekat (berinti)	Bercabang	Ada	Bulat
BW-11	Bersekat	Bercabang	Ada	Bulat
BW-12	Tidak bersekat (berinti)	Tidak bercabang	-	-



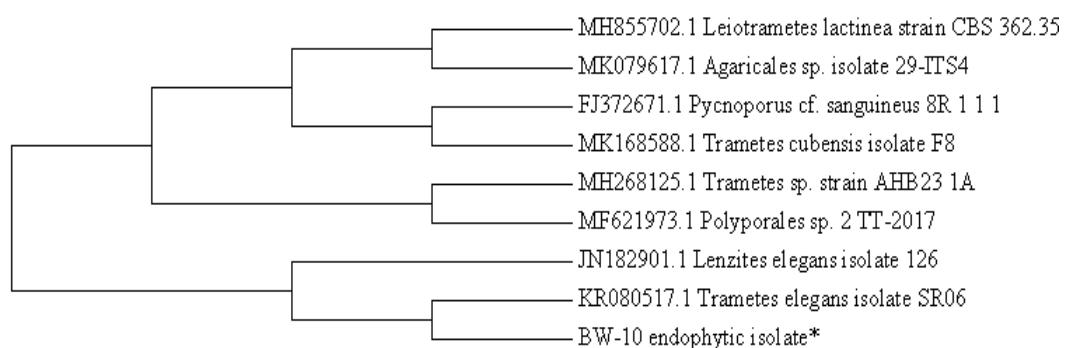
Gambar 1. Isolat Kapang Endofit Buah Belimbing Wuluh. A. Tanaman Belimbing Wuluh. B. Karakteristik Makroskopis Isolat BW-10. C. Karakteristik Mikroskopis Isolat BW-10 pada perbesaran 400x. 1-12. Isolat Kapang Belimbing Wuluh (BW-1 hingga BW-12).



Gambar 2. Persentase Penghambatan Ekstrak Isolat Kapang Endofit dari Buah Belimbing Wuluh Terhadap Aktivitas Enzim Alfa-amilase

Tabel 3. Persentase Penghambatan Akarbosa Terhadap Aktivitas Enzim Alfa-amilase

Sampel	Rerata Persentase Inhibisi ± SD
Akarbosa	74,81 ± 2,61



Gambar 3. Pohon Filogenetik Kapang Endofit Isolat BW-10 dengan menggunakan MEGA software versi 7.0.26

Pembahasan

Diabetes merupakan suatu penyakit sindrom metabolik yang ditandai dengan hiperglikemia dan disertai terganggunya metabolisme karbohidrat, protein, dan lemak karena tubuh kekurangan insulin atau insulin tidak bekerja secara efektif. Pengendalian kadar gula dalam darah telah dijadikan sebagai salah satu terapi pada pasien diabetes melitus tipe 2. Terapi dilakukan dengan menunda absorpsi glukosa melalui penghambatan kerja enzim penghidrolisis karbohidrat, seperti alfa-amilase dan alfa-glukosidase pada tahap pencernaan. Dengan terhambatnya kerja enzim tersebut maka waktu cerna karbohidrat menjadi lebih lama dan absorpsi glukosa dalam tubuh diperlambat sehingga kadar gula darah yang tinggi paska makan dapat dikendalikan.²¹

Pencarian sumber bahan alam untuk pengobatan diabetes terus dilakukan. Adanya laporan penelitian yang menyatakan bahwa produksi senyawa metabolit sekunder oleh tanaman terjadi akibat adanya interaksi antara mikroba endofit dengan tanaman itu sendiri menjadikan adanya harapan terhadap sumber baru bahan alam yang bersumber pada mikroba endofit. Beberapa penelitian telah melaporkan bahwa mikroba endofit dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang sama dengan tanaman inangnya, baik untuk pengobatan penyakit infeksi maupun penyakit yang berkaitan dengan sindrom metabolik. Kemampuan mikroba endofit menghasilkan senyawa yang sama dengan induknya akibat adanya berbagai faktor diantaranya adalah *genetic background*, ketersediaan nutrisi dan habitat tanaman tersebut.²²

Tahapan awal untuk mendapatkan mikroba endofit adalah dengan melakukan isolasi. Isolasi mikroba sudah menjadi suatu hal yang lazim dilakukan pada penelitian pencarian mikroorganisme, baik dari lingkungan maupun makanan. Pada penelitian mikroba endofit, isolasi dilakukan dengan menggunakan bagian

tanaman yang akan dieksplorasi potensi mikroba endofit yang hidup dalam jaringan organ tanaman tersebut. Pada penelitian ini, bagian tanaman yang digunakan adalah buah. Buah belimbing wuluh memiliki bentuk yang tebal dan tekstur yang padat, sehingga untuk mendapatkan kapang endofit diperlukan perlakuan fisik berupa penggerusan daging buah.²³

Proses ekstraksi diperlukan untuk mendapatkan senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh kapang endofit. Prinsip dari ekstraksi metabolit sekunder ini adalah pemisahan berdasarkan tingkat kepolaran dari suatu zat. Pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi ini adalah etil asetat yang bersifat semi polar. Penggunaan pelarut yang bersifat semi polar ini bertujuan agar metabolit sekunder baik yang bersifat polar maupun non polar pada supernatan hasil fermentasi tertarik.²⁴ Penggunaan etil asetat diharapkan mampu menarik lebih banyak metabolit sekunder seperti flavonoid dan terpenoid, yang merupakan metabolit sekunder yang memiliki aktivitas inhibisi alfa-amilase.²⁵²⁶

Pengendalian kadar gula darah merupakan suatu cara yang paling efektif dalam mengobati pasien diabetes. Hal ini dapat dilakukan dengan menghambat aktivitas enzim-enzim yang terlibat dalam metabolisme karbohidrat menjadi glukosa, salah satunya adalah enzim alfa-amilase.²⁷⁻²⁹ Saat ini obat yang digunakan untuk mengendalikan kadar gula darah adalah akarbosa, akan tetapi senyawa ini memiliki efek samping pada gastrointestinal.²⁷

Pada penelitian ini, aktivitas enzim alfa-amilase dapat dihambat oleh ekstrak metabolit sekunder kapang endofit yang diisolasi dari buah belimbing wuluh, meskipun persentase inhibisi yang dihasilkan tidak sebaik hasil yang diperoleh pada akarbosa sebagai kontrol positif (Gambar 1 dan Tabel 3). Persentase inhibisi terbesar diperlihatkan oleh isolat

BW-10 namun nilai tersebut masih lebih rendah dibandingkan persen inhibisi akarbosa (Gambar 2). Hal ini disebabkan sampel yang digunakan masih berupa ekstrak etil asetat, jika uji aktivitas enzim dilakukan dengan menggunakan isolat senyawa metabolit sekunder kapang endofit BW-10 maka nilai persen penghambatan dapat mendekati atau sejajar dengan akarbosa pada konsentrasi yang sama.

Buah belimbing wuluh telah diketahui dapat menurunkan kadar glukosa darah secara *in vivo*.³⁻⁴ Secara *in vitro*, ekstrak etanol 70% daun *A. bilimbi* Linn. dilaporkan memiliki aktivitas inhibisi terhadap enzim alfa-amilase sebesar 61,92%.³⁰ Pada ekstrak tersebut terkandung senyawa tannin dan senyawasenyawa glikosida. Pada penelitian ini belum dilakukan penapisan fitokimia terhadap ekstrak etil asetat isolat kapang endofit yang diperoleh, khususnya isolat BW-10. Adanya kemiripan sekuens dan kekerabatan yang sangat dekat antara kapang endofit isolat BW-10 dengan *Trametes elegans*, diharapkan kandungan senyawa yang dikandung oleh isolat BW-10 sama seperti senyawa yang terkandung dalam ekstrak *T. elegans*. Kapang *T. elegans* telah dilaporkan memiliki beberapa kandungan senyawa metabolit sekunder, yaitu saponin, tanin, steroid, terpenoid, dan flavonoid.³¹

Senyawa tanin dikenal sebagai inhibitor non-spesifik bagi beberapa enzim hidrolitik, termasuk alfa-amilase. Senyawa glikosida dilaporkan dapat menggantikan pati sebagai substrat, sehingga produksi glukosa dapat menurun akibat terjadinya penempelan glikosida pada enzim alfa-amilase. Selain senyawa-senyawa tersebut, beberapa metabolit sekunder lainnya pada tanaman yang dapat menurunkan kadar glukosa darah dan menghambat enzim alfa-amilase antara lain karotenoid, antosianin, flavonoid, dan senyawa fenolik.⁹ Adapun mekanisme penghambatan enzim-enzim amilase

terjadi melalui adanya kompetisi antara senyawa inhibitor dengan pati untuk dapat berikatan dengan enzim-enzim amilase yang akan menyebabkan proses pencernaan pati menjadi lambat yang berakibat pada penurunan glukosa postprandial akhir (*late postprandial glucose*).^{8,29}

Adanya kandungan yang sama antara kapang *T. elegans*³¹ dengan ekstrak daun dan buah *A. bilimbi*³⁰ memperlihatkan adanya kemampuan kapang endofit untuk dapat menghasilkan metabolit sekunder yang sama dengan tanaman inangnya. Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa kapang endofit memiliki aktivitas inhibitor alfa-amilase sama seperti tanaman inangnya, antara lain kapang endofit daun *Ocimum tenuiflorum*, kapang endofit buah *Embllica officinalis*, serta kapang endofit buah *Momordica charantia* dan *Trigonella foenumgraceum*.³²⁻³³ Hal ini memperlihatkan bahwa kapang endofit memiliki senyawa metabolit sekunder yang dapat menghambat aktivitas enzim alfa-amilase sebagaimana tanaman inangnya.

Kemampuan endofit dalam menghasilkan senyawa metabolit sekunder telah diketahui sejak lama yang diawali dengan pemanfaatan kapang endofit pada jagung untuk mengobati peradangan usus. Sejak saat itu eksplorasi mikroba endofit mulai dilakukan. Saat ini telah banyak kapang endofit yang digunakan pada berbagai industri, baik pertanian maupun kesehatan. Beberapa kapang endofit yang telah digunakan pada bidang kesehatan antara lain sebagai antimikroba (*Epichloe*, *Penicillium sp*, *Xylaria sp*, *Colletotrichum gelosporoides*, dan *Muscor albus*) dan antikanker (*Taxomyces adreanae*, *Rhinocladiella*) (aktivitas antimikroba). Pada bidang pertanian, kapang endofit yang telah digunakan adalah *Pirimospora indica*.³⁴

Kesimpulan

Pada penelitian ini diperoleh 12 isolat kapang endofit dari buah belimbing wuluh. Semua isolat memiliki kemampuan inhibisi aktivitas enzim alfa amilase dengan persentase inhibisi yang bervariasi, namun isolat dengan persentase mendekati 50% ditunjukkan oleh isolat BW-10. Hal ini menunjukkan bahwa kapang endofit yang diperoleh memiliki kemampuan penghambatan enzim alfa-amilase sebagaimana ekstrak buah belimbing wuluh dan memiliki potensi untuk dijadikan sebagai sumber baru obat antidiabetes.

Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan antara lain uji aktivitas antidiabetes terhadap enzim lainnya dan identifikasi senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh kapang tersebut.

Ucapan Terima Kasih

Terimakasih kepada Vera Ladeska, M.Farm., Apt., Ni Putu Ermi Hikmawanti, M.Farm., Andri Septiana Septiawan, dan Febria Rama Hardi yang telah menjadi bagian tim penelitian mengenai eksplorasi kapang endofit pada buah belimbing wuluh sebagai penghasil senyawa aktif. Penelitian ini terlaksana berkat bantuan dana Penelitian yang diberikan oleh Lembaga Penelitian Universitas Muhammadiyah Prof. Dr. Hamka (Nomor 181/F.03.07/2019).

Daftar Rujukan

1. Strobel G. The emergence of endophytic microbes and their biological promise. *J Fungi* [Internet]. 2018;4(2). Available from: www.mdpi.com/journal/jof
2. Sekar M, Zulhilmi M, Abdullah B, Yasser A, Bin H, Azlan N, et al. Ten Commonly Available Medicinal Plants in Malaysia Used for the Treatment of Diabetes – a Review. *Asian J Pharm Clin Res* [Internet]. 2014;7(1):1–5. Available from: <https://innovareacademics.in/journals/index.php/ajpcr/article/view/642>
3. Tan BKH, Tan CH, Pushparaj PN. Anti-diabetic activity of the semi-purified fractions of *Averrhoa bilimbi* in high fat diet fed streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci* [Internet]. 2005;76(24):2827–39. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0024320505000743>
4. Kurup SB, S M. Protective potential of *Averrhoa bilimbi* fruits in ameliorating the hepatic key enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2017;85:725–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.11.088>
5. Etxeberria U, De La Garza AL, Campin J, Martnez JA, Milagro FI. Antidiabetic effects of natural plant extracts via inhibition of carbohydrate hydrolysis enzymes with emphasis on pancreatic alpha amylase. *Expert Opin Ther Targets* [Internet]. 2012;16(3):269–97. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1517/14728222.2012.664134?journalCode=iett20>
6. Ushari R, Anusha R. In vitro anti-diabetic activity of ethanolic and acetone extracts of endophytic fungi *Syncephalastrum racemosum* isolated from the seaweed *Gracilaria corticata* by alpha-amylase inhibition assay method. *Ijcmas* [Internet]. 2015;4(1):254–9. Available from: <https://www.ijcmas.com/vol-4-1/R.Ushasri and R.Anusha.pdf>
7. Aklima J, Mojumder S, Sikdar D. Total phenolic content, reducing power, antioxidative and anti-amylase activities of five Bangladeshi fruits. *Int Food Res J* [Internet]. 2014;21(1):119–24. Available from: <http://www.ifrj.upm.edu.my>
8. Lebovitz HE. Alpha-glucosidase inhibitors. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1997;26(3):539–51.
9. Agarwal P, Gupta R. Alpha-amylase inhibition can treat diabetes mellitus. *Res Rev J Med Heal Sci*. 2016;5(4):1–8.
10. Minamiura N. Handbook of Amylases and Related Enzymes. In: The Amylase Research Society of Japan, editor. Handbook of Amylases and Related Enzymes. First Edit. Pergamon Press; 1988. p. 18–22.
11. Widowati T, Bustanussalam, Sukiman H, Simanjuntak P. Isolasi dan Identifikasi Kapang Endofit dari Tanaman Kunyit (*Curcuma longa L.*) sebagai Penghasil Antioksidan. *Biopropal Ind* [Internet]. 2016;7(1):9–16. Available from: <http://ejurnal.kemenperin.go.id/biopropal/article/view/686/1122>
12. Alwakeel SS. Molecular identification of isolated fungi from stored apples in Riyadh, Saudi Arabia. *Saudi J Biol Sci* [Internet]. 2013;20(4):311–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2013.05.002>

13. Humber RA. Fungi : Identification. In: Manual Techniques in Insect Pathology. 1994. p. 153–85.
14. Humber R. Fungi: identification. In: Manual of Techniques in Insect Pathology [Internet]. 1997. p. 153–85. Available from: http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=dEvaS9nBcEoC&oi=fnd&pg=PA153&dq=Fungi++Identification&ots=_oV4p8zdUy&sig=UvVTs21Gj0yRAI3O6KePxPkzr7c
15. Hidayati W, Padillah AN, Maharadingga ., Hikmawanti NPE, Prastiwi R, Pratiwi A, et al. The Alpha-Amylase Inhibition Potential of Endophytic Fungi from Indonesian Bay Leaves (*Eugenia polyantha* WIGHT.). Proc 1st Muhammadiyah Int Conf Heal Pharm Dev [Internet]. 2018;Volume 1(MICH-PhD):107–11. Available from: <https://www.scitepress.org/PublicationsDetail.aspx?ID=o2Fez6mZWvA=&t=1>
16. Kellogg J, Grace MH, Lila MA. Phlorotannins from alaskan seaweed inhibit carbolytic enzyme activity. Mar Drugs [Internet]. 2014;12(10):5277–94. Available from: <https://www.mdpi.com/1660-3397/12/10/5277>
17. Cengiz S, Cavas L, Yurdakoc K. Alpha-amylase inhibition kinetics by caulerenye. Mediterr Mar Sci [Internet]. 2010;11(1):93–103. Available from: <https://ejournals.epublishing.ekt.gr/index.php/hcmr-med-mar-sc/article/view/12066>
18. Promega Corporation. Techinal Manual Wizard® Genomic DNA Purification Kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Tech Bull [Internet]. 2019;1–19. Available from: www.promega.com
19. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes For Phylogenetics. In: Innis M, Geland D, Sninsky J, White T, editors. PCR Protocols: A Guide to Mehods and Applications. Academic Press; 1990. p. 315–22.
20. Hidayati W, Yuniarfi F, Shofaya L, Utomo SP. Screening And Identification Endophytic Bacteria From Indonesian Bay Leaves (*Eugenia polyantha* Wight) With Antibacteria Activity. Proceeding Kolok UHAMKA [Internet]. 2017;1(2):167–76. Available from: <https://proceedings.uhamka.ac.id/index.php/psd/article/view/43>
21. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Mol Biol Evol. 2016;33(7):1870–4.
22. Tundis R, Loizzo MR, Menichini F. Natural Products Alpha-Amylase and Alpha-Glucosidase Inhibitors and their Hypoglycaemic Potential in the Treatment of Diabetes: An Update. Mini-Reviews Med Chem. 2010;10(4):315–31. Available from: <http://www.eurekaselect.com/86183/article>
23. Jia M, Chen L, Xin HL, Zheng CJ, Rahman K, Han T, et al. A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: A systematic review. Front Microbiol [Internet]. 2016;7(JUN):1–14. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4899461/>
24. Haque MA, Rahman MR, Nahar N, Hossain MS, Hossain MS, Mosihuzzaman M, et al. Isolation of Bioactive Secondary Metabolites from the Endophytic Fungus of *Ocimum basilicum*. Dhaka Univ J Pharm Sci [Internet]. 2007;4(2):127–30. Available from: <https://www.banglajol.info/index.php/JPharmSci/article/view/215>
25. Tadera K, Minami Y, Takamatsu K, Matsuoka T. Inhibition of .ALPHA.-Glucosidase and .ALPHA.-Amylase by Flavonoids. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) [Internet]. 2007;52(2):149–53. Available from: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jnsv/52/2/52_2_149/_article
26. D'Costa VM. Sampling the Antibiotic Resistome. Science (80-) [Internet]. 2006;311(5759):374–7. Available from: <https://science.sciencemag.org/content/311/5759/374.long>
27. Noor Asna A, Noriham A. Antioxidant activity and bioactive components of oxalidaceae fruit extracts. Malaysian J Anal Sci [Internet]. 2014;18(1):116–26. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84898732909&partnerID=40&md5=3007ad3a4480118fe9e6bb3c2afc7c8f>
28. Krentz AJ. Drug Drug Therapy Therapy for Type 2 diabetes. Mott L, editor. Springer International Publishing; 2012.
29. Alagesan K, Thennarasu P, Kumar V, Sankarnarayanan S, Balsamy T. Identification of α -Glucosidase Inhibitors From *Psidium guajava* Leaves and *Syzygium cumini* Linn. Seeds. Int J Pharma Sci Res [Internet]. 2012;3(2):316–22. Available from: <http://www.ijpsr.info/docs/IJPSR12-03-02-009.pdf>
30. Singh B, Kaur A. Antidiabetic potential of a peptide isolated from an endophytic *Aspergillus awamori*. J Appl Microbiol. 2016;120(2):301–11.
31. Elya B, Handayani R, Sauriasari R, Azizahwati, Hasyyati US, Permana IT, et al. Antidiabetic activity and phytochemical screening of extracts from indonesian plants by inhibition of alpha amylase, alpha glucosidase and dipeptidyl peptidase IV.

- Pakistan J Biol Sci. 2015;18(6):273–8.
- 32. Awala SI, Oyetayo VO. The phytochemical and antimicrobial properties of the extracts obtained from *Trametes elegans* collected from Osengere in Ibadan, Nigeria. Jordan J Biol Sci. 2015;8(4):289–99.
 - 33. Pavithra N, Sathish L, Nagasai B, Venkataramanam V, Pushpalatha H, Reddy GB, et al. Evaluation of A-Amylase, A-Glucosidase and Aldose Reductase Inhibitors in Ethyl Acetate Extracts of Endophytic Fungi Isolated From Anti- Diabetic Medicinal Plants. Int Joural Pharm Sci [Internet]. 2014;5(12):5334–41. Available from: <http://ijpsr.com/bft-article/evaluation-of-alpha-amylase-alpha-glucosidase-and-aldoze-reductase-inhibitors-in-ethyl-acetate-extracts-of-endophytic-fungi-isolated-from-anti-diabetic-medicinal-plants/?view=fulltext>
 - 34. Singh R, Dubey AK. Endophytic actinomycetes as emerging source for therapeutic compounds. Indo Glob J Pharm Sci [Internet]. 2015;5(2):106–16. Available from: <https://www.semanticscholar.org/paper/Endophytic-Actinomycetes-as-Emerging-Source-for-Singh-Dubey/e75a859a3f9cac58584d63877184ebb11c0e43d2>